

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-28397

(43) 公開日 平成9年(1997)2月4日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	A
C 0 8 F 2/44	M C P		C 0 8 F 2/44	M C P
291/00	M P Z		291/00	M P Z
G 0 1 N 33/533			G 0 1 N 33/533	
33/543	5 4 1		33/543	5 4 1 A
審査請求 有 請求項の数 6 F D (全 14 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-165311

(22) 出願日 平成8年(1996)6月4日

(31) 優先権主張番号 4 5 1, 2 7 4

(32) 優先日 1989年12月14日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(31) 優先権主張番号 4 5 1, 4 8 3

(32) 優先日 1989年12月14日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(31) 優先権主張番号 4 5 1, 4 9 4

(32) 優先日 1989年12月14日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 596092654

デイド、インターナショナル、インコーポ
レイテッドアメリカ合衆国60015イリノイ、ディヤフ
ィールド、ディヤフィールドロード1717

(72) 発明者 ワン、チャオ-フェイ、ジェー

アメリカ合衆国60031、イリノイ、ガーニ
ー、フォックスレーン5040

(72) 発明者 シャー、ダイネシュ、オー

アメリカ合衆国60061、イリノイ、パーノ
ンヒルズ、アレクサンドリアドライブ235

(74) 代理人 弁理士 赤岡 迪夫 (外1名)

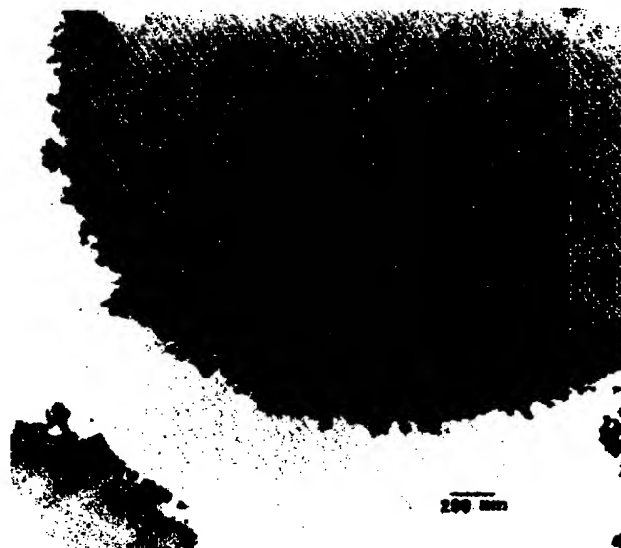
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁気応答性蛍光ポリマーの使用法

(57) 【要約】

【課題】 磁気的に分離し得る磁性粒子へ生物学的材料を固定化し、該生物学的材料へ特異的に結合する生物学的成分の選択的結合を該成分の分離に使用する生物医学的プロセスにおいて、該磁性粒子の正しい個数がウエル中へ分布されたかどうかを確認し、そしてプロセス中該磁性粒子の損失をチェックする方法を提供する。

【解決手段】 磁気的に分離し得る磁性粒子を蛍光性とし、対応する非蛍光性磁性粒子と一定割合で混合して用いる。対照チャンネルで検出した蛍光強度が平均値より低いウエルは、磁性粒子が最初から所定個数に足りなかったか、または操作途中で失われたことを指示する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】分析物の存在又は濃度を測定するための方法であって、(a) 蛍光磁性粒子であって、該蛍光磁性粒子に担持された前記分析物に特異的なリガンドを有するものを、液体標本と接触させて懸濁液を形成し、

(b) 十分な量の分析物が前記特異的なリガンドと反応するまで前記懸濁液をインキュベートし、(c) 前記磁性粒子を前記懸濁液から分離し、(d) 前記分析物に特異的な第2の標識されたリガンドを前記の分離した磁性粒子に加え、(e) 十分な量の分析物が、前記分析物に特異的な前記第2の標識されたリガンドと反応するまで該懸濁液をインキュベートし、(f) 前記磁性粒子を前記懸濁液から分離し、(g) 前記磁性粒子上の複合体形成を前記標識により検出又は測定し、そして、(h) 標識されたリガンドの測定量と対照サンプルの分析物の測定量とを関係づけることにより、前記蛍光磁性粒子が前記工程の間存在する粒子の数をモニターするために用いられるものである方法。

【請求項2】前記蛍光材料が、ナイル赤、クマリン6、クマリン4、ローダミンB、ナイル青、オキサジン725、オキサジン750又はこれらの蛍光材料の1又は2以上の混合物よりなる群より選ばれるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】前記粒子の数が、前記粒子を前記液体標本に接触させるに先立ち蛍光粒子の蛍光強度を測定することにより、及び前記蛍光磁性粒子に結合した標識されたリガンドの量を測定した後に蛍光粒子の蛍光強度を測定することにより、モニターされるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】核酸標的分子中の特定の核酸配列の存在又は濃度を測定するための方法であって、(a) 蛍光磁性粒子であって該蛍光磁性粒子に担持された前記標的分子の前記核酸配列に相補的な核酸を有するものを、液体標本と接触させて懸濁液を形成し、(b) ハイブリッド化条件下にハイブリッド化を起こさせるに十分な時間前記懸濁液をインキュベートし、(c) 前記蛍光磁性粒子を前記懸濁液から分離し、(d) 前記標的分子の前記核酸配列に相補的な第2の標識された核酸配列を加え、(e) ハイブリッド化条件下にハイブリッド化を起こさせるに十分な時間前記懸濁液をインキュベートし、(f) 前記蛍光磁性粒子を前記懸濁液から分離し、そして、(g) 前記磁性粒子上の複合体の形成を前記標識により測定することにより、前記蛍光磁性粒子が前記工程の間存在する粒子の数をモニターするために用いられるものである方法。

【請求項5】前記粒子の数が、前記粒子を前記液体標本に接触させるに先立ち蛍光粒子の蛍光強度を測定することにより、及び前記蛍光磁性粒子に結合した標識されたリガンドの量を測定した後に蛍光粒子の蛍光強度を測定することにより、モニターされるものである、請求項4

に記載の方法。

【請求項6】核酸標的分子中の特定の核酸配列の存在又は濃度を測定するための方法であって、

(a) 均一なサイズ分布と磁性含量とを有する単分散性の蛍光磁性粒子であって、(i) モノマーを吸着し得る内側コアポリマー粒子と磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せとからなり、該ポリマーが前記内側コアポリマー粒子に吸着され得るモノマーよりなり且つ1の蛍光染料又は蛍光染料の組合せを含有するものである粒子であり、

(b) 前記金属酸化物及びポリマーの組合せは前記内側コア粒子を均一に被覆するものであり、

(c) 前記磁性粒子は、均一なサイズ分布と均一な磁性含量を有し溶液中で単分散性のものであり、そして、

(d) 前記蛍光磁性粒子に担持された前記標的分子の前記核酸配列に相補的な核酸を有するものを、液体標本と接触させて懸濁液を形成することよりなる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】発明の分野

20 本発明は、磁気応答性蛍光ポリマー粒子に関する。

【0002】発明の背景

本発明は、1987年10月26日に提出された米国出願番号第113294号の一部継続である。

【0003】イムノアッセイ、アフィニティー精製等のような多くの生物学的技術においては、遊離の画分から結合した画分を分離する必要がある。磁性粒子が所望の分離を促進するために使用されてきた。

【0004】磁性粒子は、種々の工程を用いて種々の粒子状の磁性体から作られており、様々な特徴を有する。例えば、イケダ等の米国特許第4582622号にはゼラチン、水溶性多糖類、リン酸ナトリウム及び強磁性体物質よりなる磁性粒子が開示されており、米国特許第4628037号及び第4554088号にはポリマー性シランの被膜に囲まれた磁性金属酸化物コアよりなる磁性粒子が開示されており、米国特許第4452773号には水溶性多糖類又は官能基を有するその誘導体で被覆された強磁性酸化鉄(Fe_3O_4)のコアを有する分散コロイドサイズの粒子が開示されており、そしてMansfieldの米国特許第4297337号には粒子状担体としての磁性ガラス又は結晶含有材料が開示されている。

【0005】発明の概要

本発明は、磁気応答性蛍光ポリマー粒子（以下、磁性蛍光粒子という）を、形状および組成に関りなく直径で約1乃至100 μm の平均サイズを有する蛍光ポリマー性粒子から製造する新規の方法を提供する。本発明の蛍光磁性粒子は、平均サイズ約1 μm 以下の磁気応答性金属酸化物（以下、金属酸化物という）を先ず製造し、次いで蛍光ポリマー性コア粒子を金属酸化物を含有するポリマー層で被覆することによって調製することができる。

これらの蛍光磁性粒子の表面は、所望の表面特性を与えるために、ポリマー又は官能基を有するポリマーよりなる別の層で更に被覆することができる。

【0006】これらの蛍光磁性粒子のスペクトル特性は、単一の蛍光染料又は数種の蛍光染料の組合せになる、種々の蛍光染料を組み込んだコア粒子を使用することにより変化させることができる。別に、本発明の蛍光磁性粒子は、モノマーに可溶で且つ非蛍光ポリマー性コア粒子、金属酸化物及びモノマーの存在下にて重合条件に耐えることができる単一の蛍光染料又は数種の染料の組合せになる、種々の蛍光染料を組み込むことによって調製することができる。

【0007】本発明により製造される蛍光磁性粒子はサイズにおいて単分散性であり、粗い表面を有し、そして5%乃至50%、好ましくは10%乃至25%の磁性金属酸化物含量を有する。これらの蛍光磁性粒子の蛍光強度は、金属酸化物による陰影を変化させるために磁性金属酸化物含量を変えることにより、及び／又は蛍光ポリマーコア粒子に組み込む蛍光染料の量を変えることにより、調整することができる。

【0008】これらの特徴を有する粒子は、イムノアッセイ及び広範な種類の生物医学的用途に有用であることが見い出されている。これらの蛍光磁性粒子は、抗原、抗体、酵素又はDNA/RNAのような生物学的材料の受動的又は共有結合による結合に使用することができ、また種々のタイプのイムノアッセイ、DNA/RNAハイブリダイゼーションアッセイ、アフィニティー精製、細胞分離、食作用及び他の生物医学的用途のための固相として使用することができる。生物学的材料を結合した又は結合していないこれらの蛍光磁性粒子は、ウェル中に正しい数の粒子が放出されていることを確認するための、及びアッセイ中における粒子の損失をチェックするためのマーカーとして働かせるために、種々のアッセイ用の非磁性粒子に対して種々の比率で組み込むことができる。

【0009】目的及び利点

本発明の目的は次の通りである。

【0010】直ちに入手し得るポリマー粒子より磁気応答性蛍光ポリマー粒子を容易に製造する方法を開発すること。

【0011】中等度の沈降と速い磁気分離を有する磁気応答性蛍光ポリマー粒子の製造方法を開発すること。

【0012】生物学的材料を受動的吸着又は共有結合により結合させるための種々の表面電荷と官能基を有する磁気応答性蛍光ポリマー粒子の製造方法を開発すること。

【0013】これらの磁気応答性蛍光ポリマー粒子を用いた医学的、生物学的、診断的及び産業的用途を開発すること。

【0014】本発明の利点は次のものを含む。

【0015】約1乃至100 μm のサイズの広範な種類の蛍光ポリマーコア粒子を容易に磁気応答性粒子に変えることができる。

【0016】用途に応じて金属酸化物の含量を変化させることができる。

【0017】共有結合のために表面を誘導体化して種々の官能基を導入することができる。

【0018】得られるポリマーに種々の表面特性を与えるために、種々のモノマーを最終的な被覆に用いることができる。

【0019】架橋された又は架橋されていない磁気応答性蛍光ポリマー粒子のいずれをも製造することができる。

【0020】単分散性の磁気応答性蛍光ポリマー粒子を製造することができる。

【0021】発明の詳細な記述

本発明の蛍光磁性粒子は、先ず約1 μm 以下の平均サイズの金属酸化物を製造することにより調製することができる。金属酸化物は、2価又は3価の金属塩の混合物、好ましくは第1鉄及び第2鉄の硫酸塩又は塩化物と水酸化ナトリウム溶液との混合物を加熱し沈殿させることにより製造する。金属酸化物の所望のサイズ及び磁気特性を得るためには、2価の金属塩の3価の金属塩に対するモル比は0.5乃至2.0、好ましくは0.5乃至1.0の範囲で変化させることができる。2価の金属塩の3価の金属塩に対するモル比が金属酸化物のサイズに影響することが観察されている。すなわち、2価の金属塩の3価の金属塩に対するモル比が小さい程、金属酸化物のサイズは小さくなる。2価の金属塩の3価の金属塩に対するモル比はまた得られる磁性粒子の色にも影響する。すなわち、モル比が小さい程得られる磁性粒子の褐色がかかった色は明るくなる。好ましくは、金属酸化物は超常磁性又は常磁性であるが、強磁性金属酸化物もまた使用することができる。ただしこの場合は洗浄の際磁気分離の代わりに遠心が用いられる。

【0022】他の2価の遷移金属塩、例えばマンガン、マグネシウム、コバルト、ニッケル、亜鉛及び銅の塩で第1鉄塩を置き換えてもよい。

【0023】金属酸化物が沈殿した後、上澄のpHが中性となるまで、250 $\times\text{g}$ の遠心で数回それを洗浄する。金属酸化物を脱イオン水に再懸濁し、高速で機械的に攪拌して金属酸化物結晶の凝集物を破碎する。更に250 $\times\text{g}$ で遠沈しても金属酸化物の全部がペレット状になっってしまうことはない。小さいサイズの金属酸化物結晶を含有する上澄を集め、ペレットは脱イオン水に再懸濁する。この操作を少なくとも3回又は大部分の金属酸化物が250 $\times\text{g}$ ではもはやペレット状にならなくなる迄繰り返す。この方法で得られる金属酸化物のサイズは通常2.0 μm 未満である。大きい結晶を除くための100 $\times\text{g}$ の低速遠心により、サイズが0.8 μm 未満と

なる。

【0024】平均サイズ1.0 μm 以下の金属酸化物をモノマーと混合し、開始剤の存在下に1乃至100 μm のサイズの蛍光ポリマーコア粒子、好ましくはポリスチレン粒子上に被覆する。少量の乳化剤の添加は粒子が膠着するのを防止する助けとなろう。次いで蛍光磁性粒子を、金属酸化物の脱落を防止するために、ポリマー、好ましくはポリスチレンの保護層で被覆する。官能基を有する蛍光磁性粒子を望む場合には、生物学的材料を共有結合により結合させるためのカルボキシル基、アミノ基又はヒドロキシル基のような官能基を付与するため、官能基を有するポリマーよりなる別の層で磁性粒子を更に被覆することができる。

【0025】本発明に従って調製される蛍光磁性粒子は図1に示すことができる。ここにおいて1は蛍光コア粒子を表し、2は金属酸化物/ポリマー被覆を表し、3は保護ポリマー被覆を表しそして4は官能基を有するポリマー被覆を表す。図2は、本発明に従って調製される磁性粒子の0.08乃至0.1 μm の切片の透過型電子顕微鏡写真を示す。図3は、本発明に従って調製される6.8 μm の磁性粒子の走査型電子顕微鏡写真を示す。図3aは、1000倍、図3bは5000倍の拡大である。

【0026】本発明において有用な蛍光ポリマー性コア粒子は、小さい粒子の分散系として得ることのできるものであってモノマーを吸収しそれによって該コア粒子表面上への金属酸化物とモノマーとの混合物の被覆を生ずることのできるものであれば、いかなるポリマーよりなるものでもよい。コア粒子はいかなるサイズ及び形状でもよいが、好ましくは1乃至100 μm のサイズであり球形の形状になるものである。単分散性コア粒子を使用するときは、得られる磁性粒子もまたサイズにおいて単分散性となろう。コア粒子は、ジビニルベンゼン等の架橋剤を用い又は用いない乳化重合、懸濁重合又は他の重合手段によって得ることができる。コア粒子を調製するのに使用することができるモノマーには例えば、スチレン、メタクリル酸メチル、ビニルトルエン等がある。モノマーの混合物もまた使用することができる。蛍光コア粒子は、当業者に知られている種々の技術を用いて蛍光染料をコア粒子に組み込むことによって得ることができる。磁性金属酸化物による被覆又は保護被覆に使用されるモノマーは、蛍光コア粒子と同じタイプのものであってもなくてもよい。金属酸化物による被覆に使用するモノマーの蛍光コア粒子に対する重量比は、所望の金属酸化物/ポリマー層の厚さに応じて0.1乃至12、好ましくは0.2乃至6とすることができる。第1鉄塩及び第2鉄塩の混合物から調製される金属酸化物を被覆に使用する場合には、蛍光コア粒子に対しモノマーを重量比約0.1乃至0.5にて使用するのが好ましい。しかしながら、マンガン(2価)塩及び第2鉄塩の混合物から

調製される金属酸化物を被覆に使用する場合には、コア粒子に対するモノマー重量比は0.1乃至12とすることができる。結果として、通常の有機溶媒には不活性な架橋された蛍光磁性粒子を求める場合には、マンガン

(2価)塩及び第2鉄塩の混合物から調製される金属酸化物を、2%乃至10%、好ましくは8%乃至10%の重量比で架橋剤を含有し、コア粒子に対するモノマー重量比が3乃至12、好ましくは4乃至6であり、蛍光染料に対するモノマー重量比が0.1乃至1.0であるモノマーとともに使用するのが好ましい。金属酸化物/ポリマー被覆の際にコア粒子に対し一層低いモノマー重量比(すなわち0.1乃至0.5)を使用する場合には、蛍光磁性粒子表面上に金属酸化物を一層固く付着させるためにポリマー被覆による保護層で、得られる蛍光磁性粒子を保護被覆するのが好ましい。しかしながら、コア粒子に対し高いモノマー比(すなわち3乃至12)を使用する場合には、保護ポリマーによる被覆は不要である。重合温度は55℃乃至90℃、好ましくは55℃乃至65℃でよい。重合開始剤は、過硫酸カリウム等のような水溶性のものでも、過酸化ベンゾイル等のような水に不溶性のものでもよい。照射、イオン化等の他の重合開始手段もまた使用することができる。意外なことに、被覆にマンガン(2価)塩及び第2鉄塩の混合物より調製される金属酸化物を使用した場合には、何ら乳化剤を使用することなく蛍光磁性粒子を製造できることが見出された。しかしながら、被覆に第1鉄塩と第2鉄塩との混合物より調製された金属酸化物を使用した場合には、ドデシル硫酸ナトリウム、Aerosol 22, Tween 20又はNonidet P-40(NP 40)のような乳化剤の少量が金属酸化物/ポリマー被覆の間の粒子の過剰な凝集を防止するのに有用であることが見出された。同じ能力を有する他の乳化剤もまた使用することができる。金属酸化物/ポリマー被覆の間種々の量の金属酸化物を使用することにより、磁性金属酸化物の含量を5%乃至50%、好ましくは10%乃至25%の範囲で変化させることができる。金属酸化物の含量を高めるために、金属酸化物/ポリマー多重被覆を行うこともできる。所望の特性を有する磁性粒子が得られる限り、重合に通常使用される他の成分を加えてもよい。金属酸化物/ポリマー被覆のための成分は、金属酸化物/ポリマー被覆工程の最初に全部一度に加えてもよく、又は段階的に加えてもよい。第1鉄塩と第2鉄塩との混合物より製した金属酸化物を使用する場合には、成分を段階的に加えるのが好ましい。成分は真空下又はアルゴン等の不活性ガス下において、機械的攪拌、ゆすることその他の攪拌手段により混合することができる。官能基は、金属酸化物/ポリマー被覆の間モノマーと官能基を有するモノマーとの混合物を用いることによって又は官能基を有するモノマーの薄層で磁性粒子を最後に再被覆することによって蛍光磁性粒子の表面上に組み込むこと

ができる。使用する官能基を有するモノマーは、次のものの一又は混合物から選ぶことができる：メタクリル酸2-ヒドロキシエチル、メタクリル酸2-アミノエチル、メタクリル酸トリメチルアンモニウムメチルメトサルフェート、メタクリル酸ジメチルアミノエチル、メタクリル酸、ウンデシレン酸、メチルプロペンスルホン酸、ウンデシレンアルコール、オレイルアミン、メタクリル酸グリシジル、アクロレイン、グルタルアルデヒド等。磁性蛍光粒子はまた、金属酸化物/ポリマー被覆又は保護被覆に使用したのとは異なるポリマーの層で再被覆してそのポリマーの表面特性を帯びさせることもできる。

【0027】 蛍光磁性粒子の利用

蛍光イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、細胞分離、酵素固定化及びアフィニティー精製の種々の用途のための固相としての種々の蛍光磁性粒子の使用は、次の論文に例示するように、文献にて検討されている：Hirschbein et al, Chemical Technology, March 1982, 172-179 (1982); Pourfarzaneh, The Ligand Quarterly, 5 (1): 41-47 (1982); Halling and Dunnill, Enzyme Microbe Technology, 2: 2-10 (1980); Mosbach and Anderson, Nature, 270: 259-261 (1977); Guesdon et al, J, Allergy Clinical immunology, 61 (1), 23-27 (1978). いくつかの利用についてはまた、酵素固定化について米国特許第4152210号及び第4343901号に、細胞分離について米国特許第3970518号、第4230685号及び第42672343号に、イムノアッセイについて米国特許第4554088号、第4628037号及び第3933997号に夫々開示されている。

【0028】ある用途には有用であるが他の用途には有用でない磁性粒子もある。例えば、米国特許第4554088号及び第4628037号に開示されている磁性粒子は、通常ポリマー性シランの被覆に囲まれた超常磁性金属酸化物コアよりなるが、その大きな表面積と緩慢な沈澱速度のためイムノアッセイとアフィニティー精製には有用であるが、骨髓洗浄のような細胞分離への利用には適さない。これら2つの特許に開示された磁性粒子はサイズが小さいため、細胞懸濁液から全ての磁性粒子を効果的に除去することは非常に困難である。更に、小さい磁性粒子ほど正常な細胞への非特異的結合がずっと高くなる。骨髓細胞の精製のための磁性粒子の使用においては、磁性粒子はヒツジ抗マウスIgGのような抗体で被覆され、骨髓は癌細胞の表面抗原に対する数種のモノクローナル抗体の混合物で処理される。磁性粒子は癌

細胞にのみ結合し、強力な磁場を通過させることにより癌細胞を正常細胞から分離することができる。洗浄された細胞は次いで患者に戻される。

【0029】本発明の方法を用いることにより、広範な種類の生物医学的な利用のために、磁性粒子のサイズ、表面積、金属酸化物含量及び表面特性を最適にすることができる。本発明により製造される磁性粒子は、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、DNA/RNAハイブリダイゼーションアッセイその他の診断用途のための固相として使用することができる。イムノアッセイは、サンドイッチアッセイや競合的結合アッセイ等の当業者に明らかな種々の形態で行うことができる。DNA/RNAハイブリダイゼーションもまた、固相ハイブリダイゼーション又は液相ハイブリダイゼーション等の種々の形態で行うことができる。固相ハイブリダイゼーションの形態では、DNA又はRNAプローブ（キャッチャープローブ）は磁性粒子に最初に固定化される。固定化されたキャッチャープローブは、サンプル（サンプルDNA）からの相補的DNA鎖とハイブリッド化するのに使用される。最後に、蛍光性、放射性又は酵素トレーサーで標識されDNAサンプルの別の部分とハイブリッド化することのできる別のプローブ（シグナルプローブ）がシグナル発生に使用される。液相ハイブリダイゼーション形態においては、キャッチャープローブとシグナルプローブは最初に液相でサンプルDNAとハイブリッド化され、次いで磁性粒子に固定化される。

【0030】代わりに、アッセイの感度を高めるために、シグナルプローブを1個又は数個のビオチン基で標識することもでき、その場合ビオチン基を蛍光性、放射性又は酵素トレーサーで標識したアビジンと結合させることにより、シグナルが検出される。

【0031】イムノアッセイ及びDNA/RNAハイブリダイゼーションアッセイは、生物学的サンプル中の薬物、ホルモン、抗体、ペプチド、DNA, RNA, 核酸、ウイルス抗原及び炭水化物等の広範な種類の物質を測定するのに使用することができる。

【0032】本発明によって製造される磁性粒子もまた、アフィニティー精製、細胞分離、酵素固定その他の生物医学的な用途に使用することができる。細胞分離においては、磁性粒子は、免疫反応又は非免疫反応による望まない細胞の除去（ネガティブ選別）のため又は望む細胞の濃縮（ポジティブ選別）のために使用される。この原理は、骨髓から癌細胞を除去（骨髓洗浄）し、組織培養のためにポジティブ又はネガティブ選別によって細胞集団を精製し及び種々の細胞イムノアッセイを行うのに使用することができる。アフィニティー精製においては、磁性粒子は、抗体、抗原、酵素、阻害剤、コファクター、1本鎖DNA、結合タンパク、ハプテン及び炭水化物等の広範な種類の生物学的材料の精製に、ポリアク

リルアミドゲル、セファロースゲル又は他のセルロースビーズのような慣用の固相に代えて使用される。アフィニティー精製に類似の他の用途においては、磁性粒子は、抗血清又は臨床サンプルから望ましくないタンパク質成分を交差吸着して除去するのに使用することができる。酵素固定化においては、酵素活性を保持し固定化酵素の再使用を可能にするよう、種々の結合手段によって磁性粒子上に酵素が固定化される。固定化酵素を担持した磁性粒子は、炭水化物、アミノ酸及びタンパク質等の広範な種類の材料を製造するための固定化酵素システムに通常使用されるガラスビーズ、制御された多孔性ガラス、シリカゲル及びセルロースビーズ等の他の固相に代えて使用することができる。

【0033】生物学的材料を担持した又は担持しないこれらの蛍光磁性粒子は、正しい数の粒子がウエル中に放出されていることを確認するため及びアッセイ中の粒子の損失をチェックするためのマーカーとして役立てるために、実施例42及び43に述べた種々のアッセイのための非磁性粒子に対し種々の比率で組み込むことができる。

【0034】これらの利用はいずれも、磁性粒子の大部分に共通な分離容易性、速い反応速度及び大きな表面積によって効率化される。以下の実施例は本発明の多能性と利点とを更に説明するために提供するものであり、その詳細を制限的に解釈してはならない。本発明の精神と範囲から逸脱することなく種々の均等物、変更物及び修飾物の実施をなし得ることは明らかであり、そのような均等の具体例は本発明に含められることが意図されているからである。

【0035】金属酸化物の調製の一般的方法

実施例 1

機械的攪拌機、冷却器、温度計、滴下ロート及び加熱マントルを備えた三つ口丸底フラスコに、400mlの脱イオン水中に0.361molの硫酸第1鉄及び0.369molの硫酸第2鉄($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比=1)の混合物を加えた。混合物を攪拌しつつ85乃至90℃に加熱し、850mlの6N水酸化ナトリウムを90分かけて滴下して加えた。混合物を85乃至90℃にて更に1時間攪拌し、室温まで冷却した。金属酸化物の沈澱を250×gにて10分間遠心した。透明な上澄を傾斜して捨てペレットを900mlの脱イオン水中に機械的攪拌機を用いて再懸濁させた。この洗浄工程を6回又は上澄のpHが殆ど中性となるまで繰り返した。上澄を傾斜して捨て、200mlの脱イオン水に再懸濁させた。250×gで更に遠心しても金属酸化物の沈澱の全てがペレットになることはない。小さいサイズの金属酸化物結晶を含む上澄を集め、ペレットは200mlの脱イオン水に再懸濁させた。この工程は少なくとも3回又は金属酸化物の殆どが250×gではもはやペレットを生じなくなるまで繰り返した。この方法で得られる金属酸化物は通常2.

0μm未満のサイズを有する。金属酸化物の懸濁液を合わせ100×gで10分間遠心した。上澄を回収し、0.8μm未満のサイズの磁性金属酸化物の8.6%w/v懸濁液800mlを得た。

【0036】実施例 2

400mlの脱イオン水中0.235molの硫酸第1鉄、0.297molの硫酸第2鉄($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比=0.79)及び480mlの6N水酸化ナトリウムを使用して磁性金属酸化物の2.86%w/v懸濁液2000mlを得た以外は、実施例1の記載と同一の手順に従った。

【0037】実施例 3

400mlの脱イオン水中0.178molの硫酸第1鉄、0.298molの硫酸第2鉄($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比=0.59)及び520mlの6N水酸化ナトリウムを使用して磁性金属酸化物の2.98%w/v懸濁液1500mlを得た以外は、実施例1の記載と同一手順に従った。

【0038】実施例 4

400mlの脱イオン水中0.15molの硫酸第1鉄、0.276molの硫酸第2鉄($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比=0.54)及び520mlの6N水酸化ナトリウムを使用して磁性金属酸化物の6.88%w/v懸濁液700mlを得た以外は、実施例1の記載と同一手順に従った。

【0039】実施例 5

225mlの脱イオン水中0.116molの硫酸マンガ、0.146molの硫酸第2鉄($\text{Mn}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比=0.79)及び240mlの6N水酸化ナトリウムを使用して磁性金属酸化物の1.8%w/v懸濁液1700mlを得た以外は、実施例1の記載と同一手順に従った。

【0040】磁性粒子の調製

実施例 6

600mlの脱イオン水、6mlのステレン及び、実施例1の記載に従って調製した8.6%w/vの磁性金属酸化物80mlの混合物を密封された瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中1時間回転した。混合物に12gの過硫酸カリウム及び5%w/vの4.0μmポリスチレン粒子850mlを加えた。瓶を再び密封し、吸引して1時間回転し、そして2%のドデシル硫酸ナトリウム50mlを加えた。更に5時間経過後、混合物に6mlのステレン及び10gの過硫酸カリウムを加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離して上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて1.6Lとし、約11%の磁性金属酸化物含量を有し4.3μmの平均サイズを有する2.5%w/v懸濁液を得た。

【0041】実施例 7

実施例6の記載に従って調製した2.5%w/vの磁性

粒子 1.6 L を、1 g のドデシル硫酸ナトリウム、10 g の過硫酸カリウム及び、4 ml のメタノール中に 0.98 ml のウンデシレン酸と 0.02 ml のジビニルベンゼンとを含有する溶液を加えることによりカルボキシル化した。混合物を密封した瓶に加え、吸引して約 60 r p m で 55℃ のオープン中 5 時間回転した。得られたカルボキシル磁性粒子を磁氣的に分離し、上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。カルボキシル磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて 680 ml とし、約 11% の磁性金属酸化物含量を有し 4.3 μ m の平均サイズを有する 5.8% w/v の懸濁液を得た。

【0042】実施例 8

600 ml の脱イオン水、6 ml のスチレン及び、実施例 1 の記載に従って調製した 8.6% w/v の磁性金属酸化物 80 ml を密封した瓶に加え、瓶を吸引して約 60 r p m で 55℃ のオープン中 1 時間回転した。混合物に 12 g の過硫酸カリウム及び 4.78% w/v の 6.1 μ m ポリスチレン粒子 850 ml を加えた。瓶を再び密封し、吸引して 5 時間回転し、そして 6 ml のスチレン及び 10 g の過硫酸カリウムを加えた。混合物を更に 15 時間回転し、2 層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を 1.5 L の脱イオン水に再懸濁させ、1 g のドデシル硫酸ナトリウム、10 g の過硫酸カリウム及び、4 ml のメタノール中に 0.98 ml のウンデシレン酸と 0.02 ml のジビニルベンゼンとを含有する溶液を加えることによりカルボキシル化した。混合物を密封した瓶に加え、吸引して約 60 r p m で 55℃ のオープン中 5 時間回転した。得られたカルボキシル磁性粒子を磁氣的に分離して上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。カルボキシル磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて 800 ml とし、約 11.6% の磁性金属酸化物含量を有し 6.8 μ m の平均サイズを有する 4.3% 懸濁液を得た。

【0043】実施例 9

600 ml の脱イオン水、6 ml のスチレン及び、実施例 1 の記載に従って調製した 8.6% w/v の磁性金属酸化物 60 ml を含む混合物を三口丸底フラスコに加え、アルゴン雰囲気下 67℃ にて 1 時間攪拌した。混合物に 12 g の過硫酸カリウム及び 5% w/v の 2.7 μ m ポリスチレン粒子 470 ml を加えた。混合物を 67℃ にて 1 時間攪拌し、2% のドデシル硫酸ナトリウム 30 ml を加えた。アルゴン雰囲気下 67℃ にて更に 5 時間攪拌した後、混合物に 6 ml のスチレン及び 6 g の過硫酸カリウムを加えた。混合物をアルゴン雰囲気下 67℃ にて更に 15 時間攪拌し、2 層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて 900 ml とし、0.6 g のドデシル硫酸ナトリウム、10 g の過硫酸カリウム及び、2.4 ml のメタノール

ル中に 0.598 ml のウンデシレン酸と 0.012 ml のジビニルベンゼンとを含有する溶液を加えることによりカルボキシル化した。混合物を密封した瓶に加え、吸引して約 60 r p m で 55℃ のオープン中 5 時間回転した。得られたカルボキシル磁性粒子を磁氣的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。カルボキシル磁性粒子を再懸濁させて 500 ml とし、約 14% の磁性金属酸化物含量を有し 4.0 μ m の平均サイズを有する 6.5% w/v の懸濁液を得た。

10 【0044】実施例 10

600 ml の脱イオン水、6 ml のスチレン及び、実施例 1 の記載に従って調製した 8.6% w/v の磁性金属酸化物 60 ml を含む混合物を密封した瓶に加え、瓶を吸引して約 60 r p m で 55℃ のオープン中 1 時間回転した。混合物に 12 g の過硫酸カリウム及び 5% w/v の 2.7 μ m ポリスチレン粒子 470 ml を加えた。瓶を再び密封し、吸引して 1 時間回転しそして 2% のドデシル硫酸ナトリウム 30 ml を加えた。更に 5 時間経過の後、6 ml のスチレン及び 10 g の過硫酸カリウムを混合物に加えた。混合物を更に 15 時間回転し、2 層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離し、上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に懸濁させて 500 ml とし、約 14% の磁性金属酸化物含量を有し 4.0 μ m の平均サイズを有する 6.8% w/v の懸濁液を得た。

20 【0045】実施例 11

180 ml の脱イオン水、2 ml のスチレン及び、実施例 1 の記載に従って調製した 8.6% w/v の磁性金属酸化物 20 ml を含む混合物を密封した瓶に加え、瓶を吸引して約 60 r p m で 55℃ のオープン中 1 時間回転した。混合物に 4 g の過硫酸カリウム及び、実施例 10 の記載に従って調製した 6.8% w/v の磁性粒子 (3.0 μ m, 金属酸化物含量 14%) 160 ml を加えた。瓶を再び密封し、吸引して 1 時間回転しそして 2% のドデシル硫酸ナトリウム 10 ml を加えた。更に 5 時間の後、2 ml のスチレン及び 2 g の過硫酸カリウムを混合物に加えた。混合物を更に 15 時間回転し、2 層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に懸濁して 160 ml とし、約 19% の金属酸化物含量を有し 4.2 μ m の平均サイズを有する 7.78% w/v の懸濁液を得た。

30 【0046】実施例 12

90 ml の脱イオン水、1 ml のスチレン及び、実施例 1 の記載に従って調製した 8.6% w/v の磁性金属酸化物 10 ml を含有する混合物を、密封した瓶に加え、瓶を吸引して約 60 r p m で 55℃ のオープン中 1 時間回転した。混合物に 1 g の過硫酸カリウム及び、実施例 1 の記載に従って調製した 7.78% w/v の磁性粒子 (3.2 μ m, 金属酸化物含量 19%) 80 ml を加え

た。瓶を再び密封し、吸引して4時間回転し、2%のドデシル硫酸ナトリウム5mlを加えた。更に5時間経過の後、1mlのスチレン及び1gの過硫酸カリウムを混合物に加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて160mlとし、約23%の金属酸化物含量を有し4.5 μ mの平均サイズを有する4.5%の懸濁液を得た。

【0047】実施例 13

400mlの脱イオン水、1.92mlのスチレン、0.08mlのジビニルベンゼン、4gの過硫酸カリウム、20gの200~400メッシュの4%ジビニルベンゼン架橋ポリスチレンビーズ及び、実施例1に従って調製した8.6%w/vの磁性金属酸化物10mlを含有する混合物を密封された瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中15時間回転した。混合物を沈澱させ上澄を傾斜して捨てた。得られた磁性ビーズを200mlの脱イオン水に再懸濁させ再度沈澱させた。上澄が透明になる迄数回この工程を繰り返した。得られた磁性ビーズを200mlの脱イオン水に再懸濁させ、0.1gのドデシル硫酸ナトリウム、2.0gの過硫酸カリウム、0.48mlのスチレン及び0.02mlのジビニルベンゼンを加えた。瓶を再び密封し、吸引して約60rpmで55℃のオープン中1時間回転しそして、0.4mlのメタノール中に0.098mlのウンデシレン酸と0.002mlのジビニルベンゼンとを含有する溶液を加えた。混合物を更に4時間回転し、前述のように重力により沈降させることによって洗浄した。水を濾過により除去しカルボキシル磁性ビーズを乾燥して200~400メッシュのカルボキシル磁性ビーズ20gを得た。

【0048】実施例 14

100mlの脱イオン水、0.5mlのスチレン、2gの過硫酸カリウム、5%w/vの4.0 μ mポリスチレン粒子75ml及び、実施例4の記載に従って調製した6.8%w/vの磁性金属酸化物10mlを含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて150mlとし、約14%の金属酸化物含量を有し4.3 μ mの平均サイズを有する2.5%w/v懸濁液を得た。

【0049】実施例 15

実施例4の記載に従って調製した6.88%w/vの磁性金属酸化物20mlを使用して約18%の金属酸化物含量を有し4.3 μ mの平均サイズを有する2.5%w/vの懸濁液160mlを得た以外は、実施例14の記載と同じ手順に従った。

【0050】実施例 16

2000mlの脱イオン水、13mlのスチレン及び、実施例3の記載に従って調製した2.98%w/vの磁性金属酸化物550mlを含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中1時間回転した。混合物に20gの過硫酸カリウム及び10%w/vの3.0 μ mポリスチレン粒子950mlを加えた。瓶を再び密封し、吸引して約60rpmで1時間回転しそして2%のドデシル硫酸ナトリウム60mlを加えた。更に5時間の経過の後、8mlのスチレン及び100gの過硫酸カリウムを混合物に加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁して3000mlとし、約12%の磁性金属酸化物含量を有し3.2 μ mの平均サイズを有する3.38%w/vの懸濁液を得た。

【0051】実施例 17

実施例16の記載に従って調製した磁性粒子(3.2 μ m, 3.38%w/v, 金属酸化物含量12%)150ml, 2mlの1% NP40, 0.5mlのメタクリル酸メチル又はスチレン、1gの過硫酸カリウム及び、官能基を有するモノマーであるメチル硫酸メタクリル酸トリメチルアンモニウムエチル(40%水溶液)を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を約60rpmで55℃のオープン中4時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水中に再懸濁させて200mlとし、表面上にトリメチルアンモニウム官能基を有する磁性粒子の2.5%w/v懸濁液を得た。

【0052】実施例 18

官能基を有するモノマーであるメタクリル酸2-アミノエチル1mlを使用して表面上にアミノ基を有する磁性粒子の2.5%w/v懸濁液200mlを得た以外は、実施例17に記載されたと同じ手順に従った。

【0053】実施例 19

官能基を有するモノマーであるメタクリル酸2-ヒドロキシエチル1mlを使用して表面上にヒドロキシル基を有する磁性粒子の2.5%w/v懸濁液200mlを得た以外は、実施例17に記載されたと同じ手順に従った。

【0054】実施例 20

モノマーとして1-ビニル-2-ピロリジノン1mlを使用して表面上にポリビニルピロリジノンに有する磁性粒子の2.5%w/v懸濁液200mlを得た以外は、実施例17の記載と同じ手順に従った。

【0055】実施例 21

官能基を有するモノマーであるメチルプロペンスルホン酸1gを使用して表面上にスルホン酸基を有する磁性粒子の2.5%w/v懸濁液200mlを得た以外は、実施例17の記載と同じ手順に従った。

【0056】実施例 22

官能基を有するモノマーであるメタクリル酸ジメチルアミノエチル1mlを使用して表面上にジメチルアミノ基を有する磁性粒子の2.5%w/v懸濁液200mlを得た以外は、実施例17の記載と同じ手順に従った。

【0057】実施例 23

7.0%w/vの2.11 μ mポリスチレン粒子20ml, 実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物100ml, 50mlの脱イオン水及び、7.5mlのスチレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて200mlとし、約16.8%の金属酸化物含量を有し3.6 μ mの平均サイズを有する5.0%w/vの懸濁液を得た。

【0058】実施例 24

7.0%w/vの2.11 μ mポリスチレン粒子20ml, 実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物100ml, 50mlの脱イオン水及び、6.75mlのスチレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルと0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて200mlとし、約16.8%の金属酸化物含量を有し3.6 μ mの平均サイズを有する5.0%w/vの懸濁液を得た。こうして調製した架橋磁性粒子はサイズが均一であり通常の有機溶媒例えば、アセトン、アセトニトリル及びジメチルホルムアミド等に対して不活性であることが判明した。

【0059】実施例 25

7.0%w/vの2.11 μ mポリスチレン粒子20ml, 実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物150ml及び、6.75mlのスチレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルと0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封された瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて200mlとし、約23%の金属酸化物含量を有し4.0 μ mの平均サイズを有する5.4%w/vの懸濁液を得た。こうして調製した架橋磁性粒子はサイズが均一で通常の有機溶媒例えば、アセトン、アセトニトリル及びジメチルホルムアミド等に対

して不活性であることが判明した。

【0060】実施例 26

9.16%w/vの3.2 μ mポリスチレン粒子15ml, 実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物100ml, 55mlの脱イオン水及び、6.75mlのスチレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルと0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水に再懸濁して200mlとし、約16.8%の金属酸化物含量を有し5.5 μ mの平均サイズを有する4.7%w/vの懸濁液を得た。こうして調製した架橋磁性粒子はサイズが均一で通常の有機溶媒例えばアセトン、アセトニトリル及びジメチルホルムアミド等に対し不活性であることが判明した。

【0061】実施例 27

4.5%w/vの4.1 μ mポリスチレン粒子30ml, 実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物100ml, 40mlの脱イオン水及び、6.75mlのスチレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルと0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水に再懸濁して200mlとし、約16.9%の金属酸化物含量を有し6.7 μ mの平均サイズを有する4.5%w/vの懸濁液を得た。こうして調製された架橋磁性粒子はサイズが均一で通常の溶媒例えば、アセトン、アセトニトリル及びジメチルホルムアミド等に対して不活性であることが判明した。

【0062】実施例 28

7.0%w/vの2.11 μ mポリスチレン粒子20ml, 実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物100ml, 50mlの脱イオン水及び、6mlのスチレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルと0.75mlのウンデシレニルアルコールと0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた架橋ヒドロキシル磁性粒子を濾過し乾燥して約16.8%の金属酸化物含量を有し3.9 μ mの平均サイズを有する9gの粉末を得た。こうして調製された架橋ヒドロキシル磁性粒子はサイズが均一で通常の溶媒例えば、アセトン、アセトニトリル及びジメチルホルムアミド等に対し不活性であ

ることが判明した。

【0063】磁性粒子への生物学的材料の結合

実施例 29

80mlの瓶中に、実施例17の記載に従って調製した4.3μmの5.0%w/vカルボキシル磁性粒子30mlを加えた。粒子を磁気的に分離し50mlのリン酸緩衝液(0.1M, pH5.5)に再懸濁させた。粒子懸濁液に20mgのウシ血清アルブミン及び100mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を加えた。混合物を室温にて2時間回転しそして磁気的に分離した。粒子を80mlのリン酸緩衝液で1回洗い、そしてリン酸緩衝食塩水(0.1M, pH7.0)に再懸濁させて75mlとし、2.0%w/vの懸濁液を得た。

【0064】ウシ血清アルブミンを受動的吸着により磁性粒子に結合させるためにはEDCを使用しないこと以外は同じ手順に従った。

【0065】実施例 30

4mlのバイアル中に、実施例7の記載に従って調製した4.3μmの5.0%w/vカルボキシル磁性粒子1mlを加えた。粒子を磁気的に分離し2mlのリン酸緩衝液(0.1M, pH5.5)で1回洗いそして2mlの同緩衝液で再懸濁させた。粒子懸濁液に、1.4mg/mlのヤギ(Gt)抗マウス(Ms)IgG140ml及び10mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを加えた。バイアルを室温にて2時間回転した。粒子を磁気的に分離し、2mlのリン酸緩衝液で1回洗いそして2mlのリン酸緩衝食塩水(0.1M, pH7.0)で再懸濁させて2mlとし2.5%w/vのヤギ抗マウスIgG被覆磁性粒子を得た。モノクローナルな又はポリクローナルな他の種類の抗体もまた同じ手順によってカルボキシル磁性粒子に結合させることができる。

【0066】ヤギ抗マウスIgGその他の種類の抗体を受動的吸着によって磁性粒子に結合させるためには、EDCを使用しないこと以外は同じ手順に従った。

【0067】実施例 31

4mlのバイアル中に、実施例29の記載に従って調製したウシ血清アルブミン被覆磁性粒子(4.3μm, 2%w/v)2.5mlを加えた。粒子を磁気的に分離し、2mlのリン酸緩衝液(0.1M, pH5.5)に再懸濁させて2mlとした。混合物に10μLのマウス抗B赤血球表面抗原(20mg/ml)及び1mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを加えた。混合物を室温にて2時間回転した。粒子を磁気的に分離し、リン酸緩衝液で1回洗いそして2mlのリン酸緩衝食塩水(0.1M, pH7.0)に再懸濁させ、2.5%w/vの懸濁液を得た。

【0068】実施例 32

40μLのマウス抗A赤血球表面抗原(5mg/ml)を使

用して2.5%w/vの懸濁液2mlを得た以外は、実施例31の記載と同じ手順に従った。

【0069】磁性粒子を用いた血液型判定

実施例 33

Aとラベルした5mm×65mmの試験管中に、実施例32の記載に従って調製した2.5%w/vのマウス抗A被覆磁性粒子25μLを加えた。Bとラベルした別の試験管中には、実施例31の記載に従って調製した2.5%w/vのマウス抗B被覆磁性粒子25μLを加えた。双方の試験管に、パック赤血球を等張緩衝食塩水で1対100に希釈して調製した1%パック赤血球50μLを加えた。指で数回軽くたたいて試験管を振り磁石の上に置いた。結果は以下に要約した通りであった。

【0070】

		血液型			
		A	B	O	AB
試験管 A		+	-	-	+
試験管 B		-	+	-	+

【0071】ここに+は陽性反応を示す。すなわち、赤血球は対応する抗体を被覆した磁性粒子によって凝集し、その結果磁気分離後は試験管の上澄は透明であった。他方、陰性反応の上澄は、赤血球と抗体被覆磁性粒子との間での凝集がないため、磁気分離後も濁ったままである。

【0072】磁性粒子を用いたイムノアッセイ

実施例 34

2mlの微量遠心管中に、6%w/vの3μmカルボキシル磁性粒子1mlを加えた。粒子を1000rpmで3分間遠心した。上澄を吸引し、粒子を酢酸緩衝液中で5乃至100μg/mlの組み換えHBcAg1mlとともに振り混ぜることによって再懸濁させた。管を室温にて2時間回転させそして前記のように遠心した。上澄を吸引し、粒子を、酢酸緩衝液と2乃至10%の正常動物血清とを含む再被覆溶液1mlに再懸濁させた。管を室温にて2乃至16時間回転させそして前記のように遠心した。上澄を吸引し、遠心と再懸濁とにより1mlの等張緩衝食塩水(IBS)で3回洗浄した。最後に、粒子を1mlのIBSで再懸濁させ2乃至8℃にて貯蔵した。

【0073】実施例 35

96ウエルのマイクロ滴定板の最初の2列に、実施例34の記載に従って調製した0.25%w/vのB型肝炎コア抗原(HBcAg)被覆磁性粒子20μLを加えた。サンプルの調製は、HBcAg陽性血清を陰性血漿で種々に希釈し、更に各サンプルを標本希釈緩衝液(SDB)で1:100に希釈することにより行った。SDBは、リン酸緩衝液、タンパク質安定化剤、界面活性剤、及び抗菌剤を含有するものであった。粒子を含有するウエルに、各最終のサンプル希釈液50μLを加えた。37℃で30分間インキュベーションの後、粒子を磁気分離機で2分間分離し、塩類と界面活性剤とを含有する洗

浄用緩衝液200 μ Lで3回洗浄した。粒子を含む各ウエルに、塩類、タンパク質安定化剤、グリセロール、界面活性剤及び抗菌剤を含有する希釈液中のヤギ抗ヒトIgG-B-Dガラクトシダーゼ結合体(0.5 μ g/ml)50 μ Lを加えた。37℃で15分間のインキュベーションの後、粒子を分離し上記のようにして3回洗浄し、30 μ LのIBSに再懸濁させた。粒子を黒いマイクロ滴定板(Dynatech)の最初の2列に移した。粒子を含む各ウエルに、4-メチルウンベリフェリル *

表 I

陽性標本の 希釈率	AFU (5分) 2個のウエルの平均値
1:100	22687
1:1000	5933
1:5000	1516
1:8000	835
1:10000	639
1:15000	495
1:20000	427
1:25000	307

【0075】実施例 36

マウス抗HBsAgのカルボキシル磁性粒子への結合は実施例30と同様であった。

【0076】黒の96ウエルのマイクロ滴定板(Dynatech)のウエルに、0.25%w/vの3.2 μ mマウス抗HBsAg被覆カルボキシル磁性粒子20 μ Lを2列に加えた。磁性粒子を含むウエルに、種々の量のHBsAgを含有する無処理血漿又はHBsAg陰性血漿100 μ Lを加えた。37℃にて30分間インキュベーションした後、磁気分離機により粒子を2分間分離し、塩類と界面活性剤とを含有する洗浄用緩衝液100 μ Lで1回洗った。粒子を含む各ウエルに、塩類、タンパク質安定化剤、グリセロール、界面活性剤及び抗菌剤 ※

表 II

HBsAg濃度 (ng)	AFU (5分) 2個のウエルの平均値
1.0	1149
0.5	455
0.25	218
0.125	118
陰性	14

【0078】実施例 37

HTLV-IIIB/H-9細胞(Gallo株)からのHTV-1抗原を、実施例34の記載と同様の手順により3.6 μ mのカルボキシル磁性粒子に結合させた。

【0079】96ウエルのマイクロ滴定板のウエルに、0.25%w/vのHIV被覆磁性粒子20 μ Lを2列 ★50

* B-ガラクトピラノシド(MUG, Sigma)を含有する溶液100 μ Lを加えた。板を37℃にてインキュベートし、蛍光強度を、励起側365nm及び蛍光側450nmのフィルターを備えた蛍光濃度分析機(FCA, Pandex)を用い5分間隔で10倍利得にセットして測定した。5分間隔での蛍光強度の増大を任意に定めた蛍光単位(AFU)にて記録し表Iに示した。

【0074】

※を含有する希釈液中のマウス抗HBsAg-B-ガラクトシダーゼ結合体20 μ Lを加えた。37℃にて15分間インキュベーションの後、粒子を分離し上記のようにして5回洗浄した。粒子を含む各ウエルに、4-メチルウンベリフェリル-B-D-ガラクトピラノシド(MUG, Sigma)を含有する溶液50 μ Lを加えた。板を37℃でインキュベートし、蛍光強度を、励起側365nm及び蛍光側450nmのフィルターを備えた蛍光濃度分析機(FCA, Pandex)により5分間隔で10倍利得に設定して測定した。5分間隔での蛍光強度の増大を任意に定めた蛍光単位(AFU)にて記録し、表IIに示した。

【0077】

★に加えた。粒子を含むウエルに、リン酸緩衝液、タンパク質安定化剤、界面活性剤及び抗菌剤を含有する標本希釈緩衝液(SDB)に1:100に希釈した陽性、境界及び陰性の各標本50 μ Lを加えた。37℃にて30分間のインキュベーションの後、磁気分離機により2分間粒子を分離しそして塩類と界面活性剤とを含有する洗浄用緩衝液100 μ Lで3回洗浄した。粒子を含む各ウエ

ルに、塩類、タンパク質安定化剤、グリセロール、界面活性剤および抗菌剤を含有する希釈液中のヤギ抗ヒトB-ガラクトシダーゼ(約0.5 μ g/ml)結合体50 μ Lを加えた。37℃にて15分間インキュベーションした後、上記のようにして粒子を4回洗浄した。粒子を黒のマイクロ滴定板(Dynatech)に移した。粒子を含む各ウェルに、4-メチルウンベリフェリル-B-D-ガラクトピラノシド(MUG, Sigma)を含有 *

表 III

抗HIV 標本	AFU (5分) 2個のウェルの平均値
------------	------------------------

陽性対照	9462
境界標本	527
陰性対照	86

【0081】磁性粒子を用いた細胞分離

実施例 38

実施例7の記載に従って調製した4.3 μ mのカルボキシル磁性粒子を、リン酸緩衝食塩水(PBS, pH7.7)で洗浄し超音波処理し、70%エタノールで10分間滅菌し、PBSで3回洗浄し、0.5mg/mlのアフィニティ精製ヒツジ抗マウスイノグロブリン抗体(SAM)とともに3.3mg抗体/100mg粒子の比率で4℃にて48時間インキュベートした。使用前に、抗体被覆磁性粒子をPBSで洗浄し、PBS中に所望の濃度に再懸濁させた。

【0082】ヒト組織培養cALLa陽性NALM-16白血病細胞をPBSで洗い懸濁させた。一部は抗体に ※

表 IV

粒子/細胞比	+/-MoAb細胞	回収細胞	消耗%
0	+	7.62 $\times 10^5$	0 (対照)
45	+	2.89 $\times 10^4$	96.2
45	-	7.33 $\times 10^5$	4.6

【0084】実施例 39

576mlの脱イオン水、9mlのステレン及び、実施例1の記載に従って調製した3.0%w/vの磁性金属酸化物288mlを含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで65 \pm 4℃のオープン中1時間回転した。混合物に、18gの過硫酸カリウム及び5%w/vの4.0 μ m蛍光ナイル赤ポリスチレン粒子712mlを加えた。瓶を再び密封し、吸引して1時間回転し、そして2.0%のドデシル硫酸ナトリウム45mlを加えた。更に5時間経過の後、9mlのステレン及び9gの過硫酸カリウムを混合物に加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離し、そして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた蛍光磁性粒子を脱イオン水に懸濁して1580mlとし、約11.0%の磁性金属酸化物含量を有し4.4 μ mの平均サイズを有する3.0%w/v ★50

*する溶液100 μ Lを加えた。板を37℃にてインキュベートし、蛍光強度を、励起側365nm及び蛍光側450nmのフィルターを備えた蛍光濃度分析機(FC A, Pandex)を用いて5分間隔で25倍利得に設定して測定した。5分間隔での蛍光強度の増大を任意に定めた蛍光単位(AFU)にて記録し表IIIに示した。
【0080】

※よる処理をしなかった(-MoAb)。他の部分を2つの抗CD10モノクローナル抗体及び1つの抗CD9モノクローナル抗体で4℃にて30分間処理し(+MoAb), PBSで洗い、PBSにて3.5 $\times 10^6$ 個/mlに調整した。一方には抗体処理細胞(+MoAb)を含み他方には無処理細胞(-MoAb)を含む2本の試験管に、SAM被覆磁性粒子を開始時の細胞に対する粒子の比率が45となるように加えた。管を4℃にて30分間回転した。粒子を磁気分離機で分離した。上澄を回収し遠心して残存細胞を回収した。ペレットを100 μ Lのトリパンブルーに再懸濁させて全細胞数を数えた。結果を表IVに示した。

【0083】

★v懸濁液を得た。

【0085】実施例 40

実施例39の記載に従って調製した3.0%w/vの蛍光ナイル赤磁性粒子1.580Lを、1.23gのドデシル硫酸ナトリウム、17.50gの過硫酸カリウム及び、4.8mlのメタノール中に1.2mlのウンデシレン酸と0.024mlのジビニルベンゼンとを含有する溶液の添加によりカルボキシル化した。混合物を密封した瓶に加え、吸引して約60rpmで55 \sim 65℃のオープン中5時間回転した。得られた蛍光ナイル赤カルボキシル磁性粒子を磁氣的に分離し、そして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。蛍光ナイル赤カルボキシル磁性粒子を脱イオン水に懸濁させて850mlとし約11.0%の磁性金属酸化物含量を有し4.4 μ mの平均サイズを有する5.0%w/v懸濁液を得た。

【0086】実施例 41

11. 28%w/vの2.24 μ mポリスチレン粒子12. 4ml, 実施例5の記載に従って調製した2.78%w/vの金属酸化物65ml, 75mlの脱イオン水及び、6.75mlのスチレン中に0.18gの過酸化ベンゾイルと7mgのナイル赤と0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで60~70℃のオープン中約15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離し、そして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた蛍光架橋磁性粒子を脱イオン水に懸濁させて170mlとし、約16.5%w/vの金属酸化物含量を有し4.0 μ mの平均サイズを有する5.4%w/vの懸濁液を得た。

【0087】実施例 42

蛍光及び無蛍光カルボキシル磁性粒子（ほぼ同じ金属酸化物含量を有する）へのヤギ抗HBsAgの結合は実施例30と同様であった。

【0088】黒の96ウエルのマイクロ滴定板〔Pandex（登録商標）〕のウエルに、4.0 μ mの、ヤギ抗HBsAgを被覆した蛍光及び無蛍光カルボキシル磁性粒子の完全な混合物（比率1:1）、濃度0.125%w/v、の20 μ Lを加えた。磁性粒子を含むウエル

表 (1)

チャンネルC（対照チャンネル）

ウエルの数	Δ AFU範囲	Δ AFU範囲
12空	4832-4900	4867
17	29826-33200	31480
1	---	19458*
1	---	27952

【0090】*17ウエルの平均AFU 31480に対し1個のウエルのAFUが19458であることは、当該ウエルの粒子の損失又はアッセイ当初に少ない数の粒子しか放出されなかったことを示す。

【0091】実施例 43

アッセイ能力の比較のためヤギ抗HBsAgで被覆した蛍光及び無蛍光カルボキシル磁性粒子を同時にアッセイ ※

表 (2)

AFU

HBsAg濃度	蛍光粒子	無蛍光粒子
高	27238	30059
中等度	5820	5976
低	1688	1816
陰性	326	403

【図面の簡単な説明】

【図1】 蛍光磁性粒子の断面モデル図である。

【図2】 蛍光磁性粒子の断面透過型電子顕微鏡写真である。

【図3】 蛍光磁性粒子の走査型電子顕微鏡写真（10 ★50

*に、種々の量のHBsAgを含む無処理血漿又はHBsAg陰性血漿の100 μ Lを加えた。37℃にて30分間インキュベーションした後、粒子を磁気分離機により分離し100 μ Lの洗浄用緩衝液で2回洗浄した。粒子を含む各ウエルに希釈緩衝液中のマウス抗HBsAgとB-ガラクトシダーゼとの結合体20 μ Lを加えた。37℃で15分間のインキュベーションの後、粒子を分離し上記のようにして6回洗浄した。粒子を含むウエルに、4-メチルウンベリフェリル-B-D-ガラクトピラノシド（MUG, Sigma）を含有する溶液50 μ Lを加えた。板を37℃でインキュベートし、蛍光強度を、励起側525nm及び蛍光側580nmのフィルター（チャンネルC、対照チャンネル）を備えた蛍光濃度分析機〔FCA, Pandex（登録商標）〕を用い、8分間隔で25倍利得に設定して測定した。チャンネルCの蛍光強度を任意に定めた蛍光単位（AFU）で記録し表（1）に示した。結果は、蛍光磁性粒子が空のウエルを検出し、また平均蛍光強度に満たないウエルをも表示していることを示している。これはピペット操作の誤りかアッセイ中の粒子の損失によるものである。

【0089】

※において使用した以外は、実施例42の記載と同じ手順に従った。蛍光強度はチャンネルD（定量チャンネル、励起側365nm及び蛍光側450nmフィルター）を用いて測定し、表（2）に示した。結果は、蛍光及び無蛍光の粒子のいずれもアッセイにおいて同等の成績をあげたことを示している。

【0092】

★00倍）である。

【図4】 蛍光磁性粒子の走査型電子顕微鏡写真（5000倍）である。

【符号の説明】

1：蛍光コア粒子

25

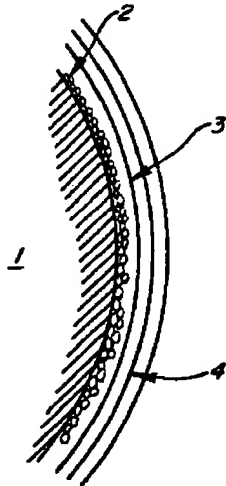
2 : 金属酸化物/ポリマー被覆層
3 : 保護ポリマー被覆

26

* 4 : 官能基含有ポリマー被覆

*

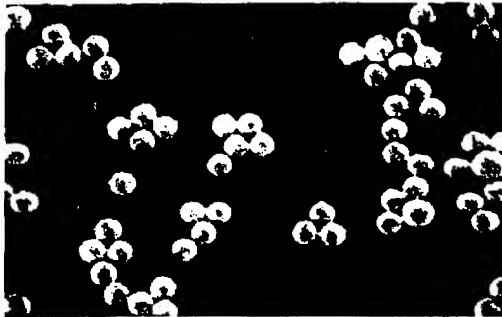
【図1】



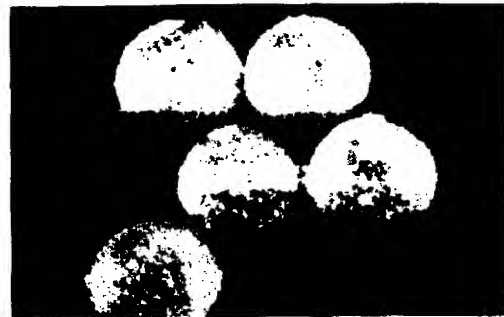
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶
// C 0 8 F 257/00
C 1 2 N 15/09

識別記号
MQH

庁内整理番号
9162-4B

F I
C 0 8 F 257/00
C 1 2 N 15/00

技術表示箇所
MQH
A

(31) 優先権主張番号 4 5 2, 0 9 9
(32) 優先日 1989年12月14日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)